

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

**Emotsionaalse käitumise iseloomustamine Wfs1-puudulikel rottidel**

Bakalaureusetöö

(12 EAP)

Laura-Liisa Rohtla

Juhendajad Sirli Raud PhD

Lilian Kadaja-Saarepuu PhD

TARTU 2017

## **Emotsionaalse käitumise iseloomustamine Wfs1-puudulikel rottidel**

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mida iseloomustab magediabeet, tüüp I suhkrudiabeet, optiline atroofia, kurtus ning mitmesugused psühhiaatrilised häired. Sündroomi põhjustavad mutatsioonid wolframiini valku kodeerivas WFS1 geenis, mille tõttu väheneb või peatub antud valgu süntees. Wolframiin on vajalik rakkude  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi säilitamiseks ning ER stressi reguleerimiseks. Selleks, et uurida Wfs1 valgu funktsiooni ning erinevaid psühhiaatrilisi patoloogiaid, on välja aretatud Wfs1-puudulikud hiired. Kuna rott on inimesele evolutsiooniliselt lähedasem kui hiir, on põhjust arvata, et rotid oleksid paljudes meditsiinilistes uuringutes sobivamad katseloomad. Antud töö eesmärgiks oli uurida Wfs1-puudulikkuse mõju rottide ärevuskäitumisele, motoorikale ja käitumuslikule meeleheitele. Ühegi katse puhul ei leitud statistiliselt olulist erinevust metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulike rottide käitumise vahel. Küll aga täheldati Wfs1-puudulike rottide vahel soolisi erinevusi.

**Märksõnad:** Wolframiin, Wfs1, Wfs1-puudulik rott, ärevus

**CERCS kood:** B470 Füsioloogia

## **Characterization of Emotional Behavior in Wfs1-Deficient Rats**

Wolfram syndrome is an autosomal recessive neurodegenerative disease characterized by diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy, deafness and various psychiatric disorders. The syndrome is caused by mutations in the WFS1 gene, which is responsible for encoding wolframine. Wolframine plays a necessary role in maintaining  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and regulating ER stress. In order to better understand the function of wolframine and observe various psychiatric pathologies, several strains of Wfs1-deficient mice have been developed. The fact that humans have a higher evolutionary proximity to rats than to mice leads us to consider that rats might be preferable test subjects in medical research. The goal of this paper was to evaluate the impact of Wfs1 deficiency on anxiety-related behaviour, motor activity and behavioural despair in rats. None of the tests showed any statistical differences between the behaviour of wild type and Wfs1-deficient rats. However, remarkable differences were observed between male and female Wfs1-deficient rats.

**Keywords:** Wolframine, Wfs1, Wfs1-deficient rat, anxiety

**CERCS code:** B470 Physiology

# Sisukord

Infoleht.....	2
Sisukord.....	3
Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduslik ülevaade .....	6
1.1 Wfs1 geen ja valk .....	6
1.2 Wolframi sündroom .....	8
1.3 Wfs1-puudulikud hiired.....	8
2. Uurimus.....	10
2.1 Töö eesmärgid.....	10
2.2 Materjal ja metoodika.....	10
2.2.1 Katseloomad.....	10
2.2.2 Katsemeetodid .....	11
2.2.3 Andmetöötlus.....	14
2.3 Tulemused .....	15
2.3.1 Null-puuri katse .....	15
2.3.2 Lokomotoorse aktiivsuse katse .....	16
2.3.3 Hele-tume puuri katse.....	17
2.3.4 Sundujumise katse .....	18
2.3.5 Rotarodi katse .....	18
2.4 Arutelu.....	20
Null-puuri ja hele-tume puuri katsed .....	20
Lokomotoorse aktiivsuse katse .....	22
Sundujumise katse .....	22
Rotarodi katse .....	23
Kokkuvõte.....	24
Resümee.....	24
Tänuõnad.....	26
Kasutatud kirjandus.....	27
Kasutatud veebiaadressid .....	31
Lihtlitsents .....	32

## Kasutatud lühendid

ANOVA – *Analysis of variance*

CA1 – Cornu Ammonis 1

cAMP – Tsükliline adenosiinmonofosfaat

DA – Dopamiin

DIDMOAD – *Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy and Deafness*

ER – Endoplasmaatiline retiikulum

GABA – Gamma-aminovõihape

HPA telg – Hüpotalamus-hüpofüüs-adrenaal-telg

SD – *Sprague Dawdley*

WFS1 – Wolframi geen või valk inimesel

Wfs1 – Wolframi geen või valk inimesest erineval liigil

WS – Wolframi sündroom

ZFN – *Zinc finger nuclease*

## Sissejuhatus

Wolframi sündroom on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus, mida põhjustab mutatsioon Wfs1 geenis. Mutatsiooni tulemusena häirub või peatub wolframiini (Wfs1) valgu tootmine. Wfs1 valk ekspresseerub eelkõige pankreases, kopsudes, südames ning ajus ja on vajalik rakkudes  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi hoidmises ning ER stressi regulatsioonis. Valgu puudumine võib põhjustada rakkude apoptoosi, mille tagajärjeks on muuhulgas diabeet, optiline atroofia ja kurtus.

Wolframi sündroomi põdevatel patsientidel esineb ka suurema tõenäosusega psühhiaatrilisi häireid, sealhulgas bipolaarset häiret ja depressiooni. Wfs1-puudulikel katseloomadel on näidatud suurenud ärevus- ja vältimiskäitumine koos vähenenud stressitaluvusega. Molekulaarbioloogilistes uuringutes on selgunud, et Wfs1-puudulike hiirte käitumuslikud muutused tulenevad häirunud gamma-aminovõihappe, serotoniini- ja dopamiinergilise süsteemi talitlusest, mitte häirunud mootorikast.

On teada, et hiirega võrreldes on roti aju funktsioneerimine inimesele oluliselt sarnasem ning et rott on inimesele evolutsiooniliselt lähemal kui hiir. See annab põhjust arvata, et rotid oleksid paljudes meditsiinilistes uuringutes sobivamad katseloomad kui hiired. Hiljuti loodud Wfs1-puudulike rottide emotsionaalse käitumise kohta puuduvad aga veel andmed, mis näitaksid, et neid saab kasutada ärevuse ja depressiooni uurimiseks. Seeõttu oli töö eesmärgiks uurida naiivsete Wfs1-puudulike rottide ärevuskäitumist (null-puuri katse, heletume puuri katse), käitumuslikku meeleheidet, mis on depressioonile iseloomulik omadus (sundujumise katse) ja mootorset aktiivsust (liikumisaktiivsuse katse ja rotarodi katse).

Töö teostati Tartu Ülikooli siirdemeditsiinikeskuses.

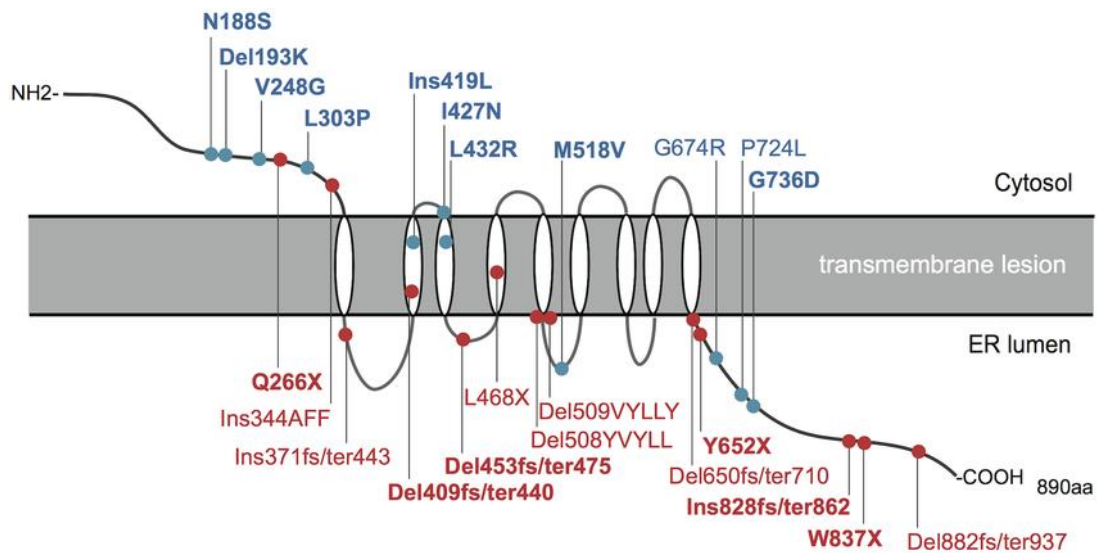
# 1. Kirjanduslik ülevaade

## 1.1 Wfs1 geen ja valk

Wfs1 geen on endoplasmaatilise retiikulumi (ER) glükoproteiini, wolframiini, kodeeriv järjestus, mis asub inimesel 4. kromosoomi p-õlal, 16.1. positsioonis (Collier jt., 1996). Geeni kirjeldati esmakordselt 1998. aastal Ameerika ja Jaapani tööühmade poolt, mil avastati selle osalus Wolframi Sündroomi kujunemises (Inoue jt., 1998; Strom jt., 1998). 33,4 kb suurune geen koosneb kaheksast eksonist, millest esimene on mittekodeeriv ning viimane, kaheksas, sisaldab enamuse kogu wolframiini valku kodeerivast järjestusest (Strom jt., 1998).

Wolframiin (joonis 1) on 890-aminohappeline valk, mis omab sekundaarstruktuuri ning on umbes 100 kDa molekulmassiga (Strom jt., 1998). See koosneb hüdrofiilsest ER luumenis paiknevast C-terminusest, hüdrofoobsest tsütoplasmas paiknevast domäänist N-terminusel ning tsentraalsest domäänist, mis omakorda moodustub üheksast kuni kümnest transmembraansest segmendist. On leitud, et Wfs1 valku modifitseeritakse post-translatsiooniliselt N-glükosülatsiooni kaudu. See protsess on vajalik valgu stabiliseerimiseks (Hofmann jt., 2003).

Erinevad mutatsioonid võivad põhjustada wolframiini taseme vähenemist või täielikku kadu, olenevalt nende asukohast ja ulatusest. Mutatsioonid võivad olla nii raaminihke, stop, *missense* kui ka *splaiss* mutatsioonid (Hardy jt., 1999; Awata jt., 2000; Cryns jt., 2003). Tänapäevaks on neid avastatud üle 140, millest enamus asuvad kaheksandas eksonis (Rendtorff jt., 2011).



**Joonis 1.** Skeem WFS1 valgust ning selle mutatsioonidest. Ära on toodud mutatsioonide suhtelised asukohad. Punasega on märgitud täielikult vaigistavad mutatsioonid, sinisega osaliselt vaigistavad mutatsioonid. (complete loss of function). Hiljuti avastatud mutatsioonid on rasvases kirjas (Matsunga jt., 2014).

Kuigi Wfs1 valgu funktsioon on tänaseni täpselt kirjeldamata, on uuringud näidanud selle osalust mitmetes protsessides, eelkõige ER stressi regulatsioonis. On leitud, et Wfs1 võib osaleda  $\text{Ca}^{2+}$  homöostaasi säilitamises, reguleerides ionkanalite tööd (Osman jt., 2003; Yamada jt., 2006; Fonseca jt., 2010).

Eelnimetatud mehhanismiga seotult reguleerib Wfs1 näiteks cAMP ja insuliini tootmist ning osaleb oligomeersete valkude subühikute pakkimises (Fonseca jt., 2012). Samuti omab valk olulist rolli naatrium-kaalium ATPaasi töös ning tema subühikute valmistamisel (Zatyka 2008).

Wfs1 ekspressiooni on kirjeldatud eelkõige ER-s ning pankrease  $\beta$  –rakkude sekretoorsetes graanulites (Osman jt., 2003; Hatanaka jt., 2011). Wfs1 valku leidub kudedes üle terve organismi, kuid seda on kõige enam pankreases, kopsudes, südames, ajus ja platsentas (Inoue jt., 1998). Wfs1 tase varieerub erinevates aju osades ning on esindatuim hipokampuse CA1 neuronites, allokorteksi pindmises kihis, mandelkehas ja haistesagaras (Takeda jt., 2001; Luuk jt., 2009). On näidatud, et stressifaktorite juuresolekul suureneb Wfs1 mRNA hulk oluliselt mandelkehas ja CA1 regioonis, mis illustreerib Wfs1 osalust aju tegevuses ning meeleoluhäirete kujunemises (Köks jt., 2002).

## 1.2 Wolframi sündroom

Wolframi sündroom tüüp 1 (WS, MIM222300), tuntud ka kui DIDMOAD (*diabetes insipidus* e magediabeet, *diabetes mellitus* e tüüp I suhkrudiabeet, optiline atroofia ja kurtus), on autosomaalne retsessiivne neurodegeneratiivne haigus (Domenech jt., 2006). Sündroomi kirjeldati esmakordselt 1938. aastal Wolframi ja Wageneri poolt kui juveniilset diabeeti (Wolfram ja Wagener, 1938). WS esinemissagedus on umbes 1:770 000 ning 1:150 tüüp 1 diabeetikutel (Barrett jt., 1995). WS sündroomi tekkepõhjuseks peetakse närvirakkude ja pankrease  $\beta$ -rakkude ulatuslikku apoptoosi, mis kujuneb välja WFS1 valgu puudumisele iseloomulikust kroonilisest ER stressist (Riggs jt., 2005; Yamada jt., 2006).

WS esimesteks nähtudeks on optiline atroofia ja insuliini-puudulik *diabetes mellitus*, mis kujunevad reeglina välja varases lapsepõlves ning *diabetes insipidus*, mis ilmneb teismeeas või varajases täiskasvanueas. Sensoneuraalne kurtus avaldub keskmiselt hilises teismeeas. WS all kannatavate patsientide oodatavaks elueaks on 25–40 aastat ning surma levinuimaks põhjuseks on ajutüve atroofiast põhjustatud hingamisteede rikked (Barrett jt., 1995; Strom jt., 1998).

WS patsientidel on kirjeldatud ka komplikatsioone neerutraktis, ataksiat, perifeerset neuropaatiat ja erinevate psühhiaatriliste häirete nagu bipolaarse depressiooni, psühhoosi, skisofreenia ja ärevushäirete esinemist, kusjuures psühhiaatriliste häirete tekke risk on 26 korda kõrgem kui isikutel, kes on mutatsiooni suhtes heterosügootsed (Swift jt., 1998). WFS1 mutatsiooni kandjatel (nii heterosügootidel kui homosügootidel) on täheldatud kõrgemat suitsiidiriski, kuigi kõik uuringud antud väidet ei kinnita (Crawford jt., 2002; Sequeira jt., 2003; Cheng jt., 2006).

## 1.3 Wfs1-puudulikud hiired

Selleks, et iseloomustada Wfs1 valgu funktsiooni ning erinevaid psühhiaatrilisi häireid, on loodud *knock-out* katseloomad, kellel on inaktiveeritud Wfs1 valgu kodeeriv geen. Praeguseks on Wfs1-puudulikke hiiri loodud kahe erineva teadusgrupi poolt (Ishihara jt., 2005; Luuk jt., 2009).

Tartu Ülikooli füsioloogiaosakonnas loodud Wfs1-puudulikel hiirtel on vaigistatud geenid Wfs1 järjestuse kaheksandas eksonis. Füsioloogilistest erinevustest tuleb esile nende



väiksem kaal võrreldes metsik-tüüpi hiirtega. Wfs1-puudulikel hiirtel on täheldatud pankrease  $\beta$ -rakkude apoptoosist tulenevat progressiivset insuliinipuudulikkust. Loomadel on häirunud dopamiinergilise (DA) ning GABA-ergilise süsteemi talitlus. (Raud jt., 2009; Matto jt., 2011; Visnapuu jt., 2013). DA-ergilise süsteemi häirunud funktsiooni on eelnevalt seostatud meeleoluhäirete tekkimisega (Salamone jt., 2012).

Wfs1-puudulike ja metsik-tüüpi hiirte vahel esinevad ka mõningad käitumuslikud erinevused. Wfs1-puudulikud loomad on stressiolukorras suurema vältimiskäitumise ja kõrgema kortikosterooni tasemega (Luuk jt., 2009). Inimeste puhul võivad vältimiskäitumine ja hüpotaalamuse-hüpofüüsi-neerupealise telje (HPA telg) ülemäärane aktiveerumine viia stressiga seotud meeleoluhäirete kujunemiseni (Billings ja Moos, 1984).

Motoorse ja sensoorse võimekuse poolest on Wfs1-puudulikud hiired sarnased metsik- tüüpi hiirtega (Luuk jt., 2009).

Wfs1 puudulikel hiirtel, kes aretati Jaapani teadlaste poolt Tohoku Meditsiinilises Ülikoolis, on vaigistatud Wfs1 geeni teine ekson. Need Wfs1-puudulikud hiired on metsik-tüüpi hiirtele analoogsed nii välimuse, kasvu kui viljakuse poolest. Erinevalt metsik-tüüpi loomadest on neil vähenenud insuliini sekretsioon, kuid diabeeti paljudel juhtudel välja ei kujune. Kuigi diabeedile omased tunnused ei ole nii väljendunud kui WS patsientidel, esineb ka hiirtel progressiivne  $\beta$  -rakkude kadu ja häirunud glükoosi homöostaas (Ishihara jt., 2004). Käitumiskatsetest ilmneb, et jaapanlaste loodud Wfs1-puudulikele hiirtele on iseloomulik aeglasem reageerimine keskkonnale, mis on melanhoolse depressiooni tunnus, antisotsiaalsus ning vähenenud vältimiskäitumine. Motoorses ega sensoorses võimekuses erinevusi metsik-tüüpi hiirtega ei täheldatud. (Kato jt., 2008).

## 2. Uurimus

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärkideks oli uurida, kas Wfs1-puudulikkus mõjutab rottide:

- ärevusega seotud käitumist
- depressiooniga (käitumusliku meeleheitega) seotud käitumist
- motoorset aktiivsust

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Katseloomad

Wfs1-puudulike rottide loomiseks kasutati Sigma Zinc finger protein (ZFN) tehnoloogiat, mille abil deleteeriti Wfs1 geeni viies ekson ning osa neljanda ja viienda eksoni vahelisest intronist. Geneetilise taustana kasutati Sprague-Dawdley (SD) rotiliini. Rottide loomine toimus Michigani Ülikoolis, Charles River Laboratooriumis, edasine paljundamine teostati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditSiini instituudi katseloomakeskuses ning genotüpeerimine teostati Tartu Ülikooli füsioloogia õppetoolis.

Käesolevas töös kasutati katseloomadena 3.5–4.5 kuu vanuseid isaseid ja emaseid metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulikke rotte. Loomi hoiti 12 h valgustsüklis *ad libitum* juurdepääsuga toidule ning veele, välja arvatud katsete vältel. Kõik katsed teostati Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditSiini instituudi katseloomakeskuse käitumiskatsete ruumides, kella 09:00 ja 17:00 vahel. Enne iga katse teostamist viidi loomad katseruumi tunniks ajaks kohanema.

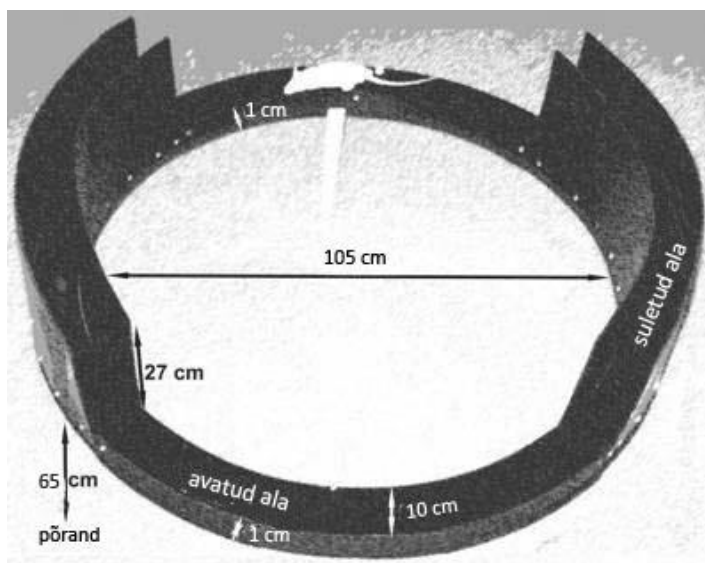
Katsed jagunesid kahte käitumisblokki: 1) kahe-katseline (lokomotoorse aktiivsus katse ja käitumusliku meeleheite katse) ja 2) kolme-katseline (null-puuri katse, hele-tume puuri katse ja rotarodi katse). Esimeses katseblokkis kasutati 7 isast metsik-tüüpi ja 7 isast Wfs1-puudulikku ning 12 emast metsik-tüüpi ja 12 emast Wfs1-puudulikku looma. Teises katseblokkis kasutati 8 isast metsik-tüüpi ja 8 isast Wfs1-puudulikku ning 12 emast metsik-tüüpi ja 12 emast Wfs1-puudulikku looma.

Katseid teostati Eesti Vabariigi Põllumajandusministeeriumi poolt välja antud loa number 57 alusel.

## 2.2.2 Katsemeetodid

### 2.2.2.1 Null-puuri katse

Null-puuri katse on ärevust hindav käitumistest, mis põhineb näriliste loomupärasel vastumeelsusel uudsete avatud alade suhtes (Shepherd jt., 1994). Katseseade koosneb mustast sõõrikukujulisest platvormist (diameeter 105 cm, laius 10 cm), mis asub põrandast 65 cm kõrgusel. Platvorm on jagatud neljaks võrdseks osaks, millest kaks on ümbritsetud 27 cm kõrguste metallist seintega (suletud ala). Ülejäänud kaks osa on piiritletud 1 cm kõrguse äärega (avatud ala) (joonis 2).

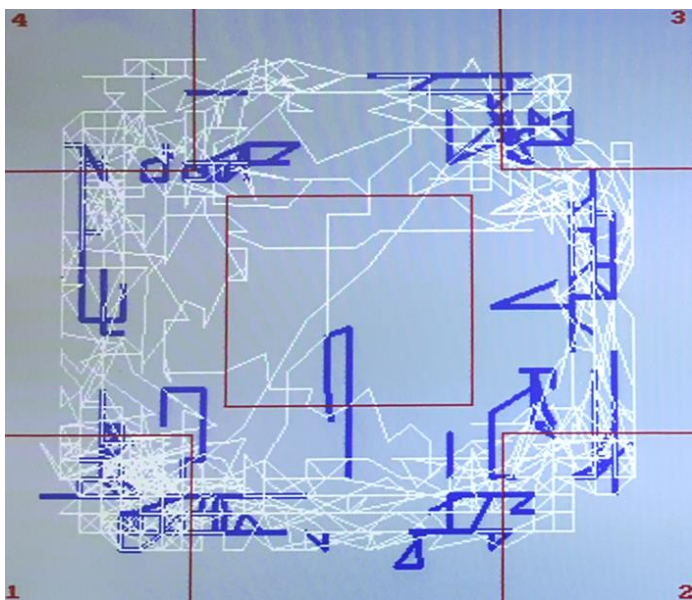


*Joonis 2. Null-puuri katseis kasutatav platvorm ja selle mõõdud (Phenome kodulehekül, 2008)*

Kuna varasemalt on näidatud, et lühiajaline isolatsioon puurikaaslastest suurendab looma uudistamisaktiivsust (Raud jt., 2009), siis isoleeriti loom puurikaaslastest 15 minutiks ja seejärel pandi null-puuri. Rott asetati suletud ala algusosasse näoga avatud ala poole. Katse kestus oli 5 minutit ja selle jooksul hinnati avatud alasse sisenemiste arvu (kordades) ja seal viibimise aega (s). Samuti määrati nn riski hindamise käitumist: avatud alalt allavaatamiste arvu (kordades) ja venitatud kehaasendite ja väljumiskatsete (kordades) summat. Pärast igat katset loomaga puhastati katseseade 70 % etanoolilahusega ja kuivatati paberkäterätikutega. Eksperiment viidi läbi valgustatud ruumis (valgustus 550 lx).

#### 2.2.2.2 Lokomotoorse aktiivsuse katse

Rottide motoorset aktiivsust mõõdeti 30 minuti vältel helikindlates fotoelektriliste sensoritega varustatud kastides (44.8 cm × 44.8 cm × 45 cm), mis olid ühendatud arvutiga (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Germany). Arvuti registreeris katseseadmes läbitud vahemaa (m) ning tagakäppadele tõusude arvu (kordades). Näide roti poolt läbitud trajektoorist on esitatud joonisel 3. Iga looma järel puhastati katseseade 70 % isopropanoolilahusega (katseseadme ehituseks kasutatud materjali pind oleks etanoolilahuse kasutamisel võinud kahjustuda) ja kuivatati paberkäterätikutega. Eksperiment viidi läbi heledalt valgustatud ruumis (valgustus 450-550 lx).



*Joonis 3. Näide arvutiga registreeritud roti trajektoorist liikumisaktiivsuse katses (Autori foto, 2017).*

#### 2.2.2.3 Hele-tume puuri katse

Hele-tume puuri katse on ärevustest, mis baseerub näriliste vastumeelsusel eredalt valgustatud alade suhtes (Bourin ja Hascoët, 2003). Katseseade mõõtmetega 46.5 cm x 46.5 cm x 30 cm oli jaotatud kaheks võrdseks osaks: üks osa (hele ala), oli valgustatud lambiga (valgustus 63.5 lx), teine osa (tume ala) oli mustade seintega ning kaanega kaetud. Hele ja tume ala olid teineteisest eraldatud vaheseinaga, milles oli ava (11 cm × 9 cm) ja mida sai sulgeda üles-alla liigutatava uksega. Ukse kinni- ja lahtioleku reguleerimine ja parameetrite registreerimine toimus arvuti abil (TSE, Technical & Scientific Equipment

GmbH, Germany). Suurendamaks uudistamisaktiivsust, isoleeriti esmalt loom puurikaaslastest 15 minutiks ja seejärel pandi tumedasse alasse. 10 s möödudes tõsteti vaheseina üks üles ja 10 minuti jooksul registreeriti heledasse alasse sisenemise latents (s), heledas alas viibitud aeg (s), heledasse alasse minekute arv (kordades) ja heledas alas läbitud teepikkus (cm). Pärast igat katset puhastati katseseade 70 % isopropanoolilahusega ja kuivatati paberkäterätikutega.

#### *2.2.2.4 Sundujumise katse*

Sundujumise katse viidi läbi kirjeldamaks käitumuslikku meeleheidet, mis on omane depressioonile (Porsolt, 1979; Cryan jt., 2002). Esmalt teostati treening, pannes loom 15 minutiks 24 °C ja 31 cm kõrguseni veega täidetud plastmassist silindrisse (30 cm × 44 cm) ujuma. 24 h hiljem tehti analoogsetel katsetingimustel katse, kus mõõdeti 5 minuti jooksul looma immobiilsuse aega (s) ning loendati sukeldumiste arvu (kordades). Imobiilsuseks loeti hulpimist, mispuhul loom ei liigutanud rohkem kui seda oli vaja pea vee kohal hoidmiseks. Loomade käitumine salvestati videosalvestustena, mida hiljem analüüsiti. Pärast igat katset vahetati silindris vett.

#### *2.2.2.5 Rotarodi katse*

Rotarodi katse on koordinaatsiooni ja peenmotoorikat hindav katse (Caston jt. 1995). Katsetes kasutatud seade on esitatud joonisel 4. Katseseade koosnes pöörlevast võllist (läbimõõt 5.5 cm), mille pöörlemiskiiruse regulatsioon ja katseparameetrite registreerimine toimus arvuti abil (TSE, Technical & Scientific Equipment GmbH, Germany). Esmalt tehti loomale treening, pannes ta pöörlevale võllile (9 pööret minutis), millel pidi liikuma ühe minuti (*cut-off time* 5 minutit). Kui see ebaõnnestus, korrati treeningut 15 minutit hiljem (ühe looma kohta tehti maksimaalselt 3 treeningut 15-minutiliste intervallidega). 1-minutilise võllil püsimise korral tehti umbes 30 minuti pärast loomaga esimene katse võlli pöörlemiskiirusel 9 pööret/min ja registreeriti latents esimese kukkumiseni võllilt ja kukkumiste arv 5 minuti jooksul. 30 minuti pärast tehti teine katse, mispuhul rotarodi võlli pöörlemiskiirus oli ühtlaselt suurenev (5 minuti jooksul oli kiirenemine 9 pöördelt/min 40 pöördeni/min) ning registreeriti latents esimese kukkumiseni võllilt ja võlli pöörlemiskiirus esimese kukkumise momendil.



*Joonis 4. Rotarodi katse läbiviimiseks kasutatud seade (Animalactivity kodulehekül, 2017)*

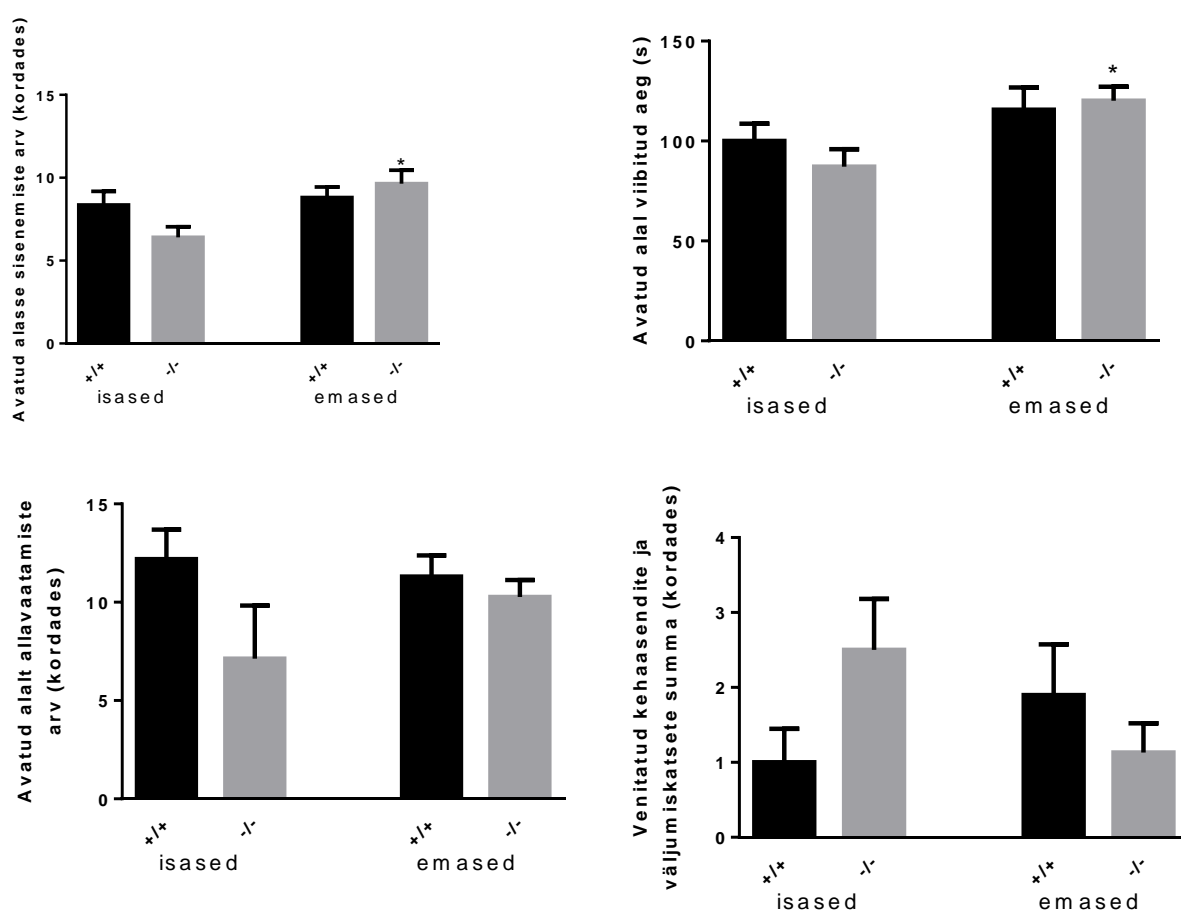
### 2.2.3 Andmetöötlus

Andmetöötluseks kasutati programmi Statistica V10 (Statsoft Inc., Oklahoma, USA). Lokomotoorse aktiivsuse katsetes kasutati kolme-faktorilist (genotüüp, sugu, päev) dispersioonanalüüsi, ülejäänud katsete puhul kahe-faktorilist (genotüüp, sugu) dispersioonanalüüsi. Kõigi analüüside puhul rakendati *post hoc* testina Unequal N Tukey's HSD testi. Tulemused on esitatud keskmistena koos standardveaga ( $\pm$  S.E.M). Olulisusnivooks võeti 0.05. Joonised koostati programmiga Graphpad Prism 6.

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Null-puuri katse

Kahe-faktoriline (genotüüp, sugu) dispersioonanalüüsi viitas avatud alasse sisenemiste puhul olulisele soo efektile ( $F(1,36)=5.52$ ;  $p<0.05$ ) ning tendentsi soo ja genotüübi interaktsioonile (sugu x genotüüp ( $F(1,36)=3.17$ ;  $p=0.08$ )). Järgnev *post hoc* analüüs näitas, et isased Wfs1-puudulikud rotid sisenesid avatud alale statistiliselt vähem kordi kui emased Wfs1-puudulikud rotid (joonis 5). Isaste gruppide võrdlusest ilmnas, et see parameeter on väiksem Wfs1-puudulikel rottidel, kuid see erinevus ei ületanud olulisuse nivood.



**Joonis 5.** Null-puuri katse tulemused metsik-tüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikel (-/-) rottidel. \* $p<0.05$

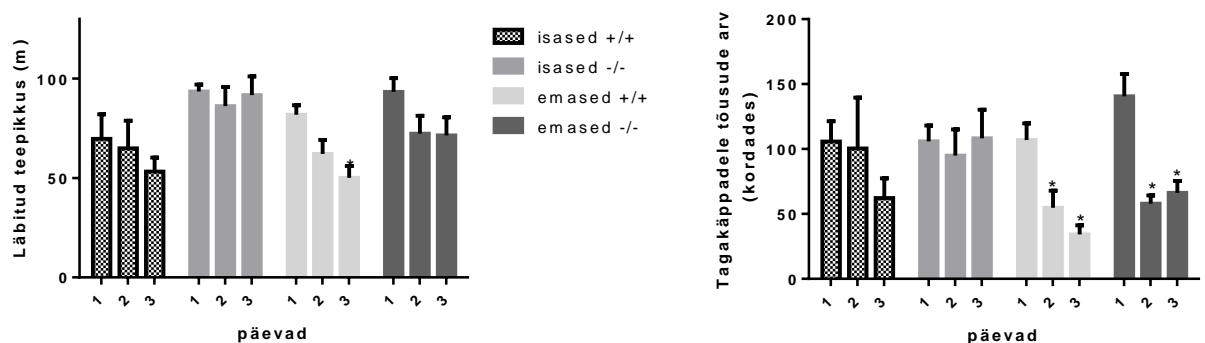
Avatud alal viibimise aja puhul oli statistiliselt oluline soo efekt ( $F(1,36)=6.97$ ;  $p<0.01$ ). *Post hoc* analüüsist selgus, et isased Wfs1-puudulikud rotid viibisid avatud alal statistiliselt lühemat aega kui emased Wfs1-puudulikud rotid. Isaste rottide omavaheline võrdlus näitas, et Wfs1-puudulikud rotid olid avatud alal lühemat aega, kuid see erinevus ei ületanud olulisuse nivood.

Avatud alalt alla vaatamiste puhul osutus statistiliselt oluliseks genotüübi efekt ( $F(1,36)=4.69$ ;  $p<0.05$ ). Järgnev andmete statistiline analüüs näitas, et isased Wfs1-puudulikud rotid tegid vähem avatud alalt allavaatamisi võrreldes isaste metsik-tüüpi rottidega, ent see polnud statistiliselt oluline.

Venitatud kehaasendite ja avatud osale väljumis katsete summa puhul ei leitud olulisi genotüübi ega soo efekte.

### 2.3.2 Lokomotoorse aktiivsuse katse

Kuna katse kestis kolm päeva, sai sellega hinnata nii lokomotoorset aktiivsust kui ka kohanemisvõimet stressiga. Läbitud teepikkuse puhul leiti statistiliselt oluline genotüübi efekt ( $F(1,34)=11.26$ ;  $p<0.01$ ) ja aja efekt ( $F(1,34)=6.18$ ;  $p<0.01$ ). Järgnevalt tehtud *post-hoc* analüüs ei näidanud ei genotüübi ega sugudevahelisi statistiliselt olulisi erinevusi esimese päeva läbitud teepikkuses (joonis 6).



Joonis 6. Lokomotoorse aktiivsuse katse tulemused metsik-tüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikel (-/-) rottidel. \* $p<0.05$

Statistiliselt oluline erinevus esines emaste metsik-tüüpi hiirte esimese ja kolmanda katsepäeva läbitud teepikkuses, mis vähenes märkimisväärselt viimaseks katsepäevaks. Sama trend oli täheldatav ka teiste gruppide puhul, välja arvatud isaste Wfs1-puudulike rottide puhul, kellel kolmandaks päevaks antud parameeter ei vähenenud.

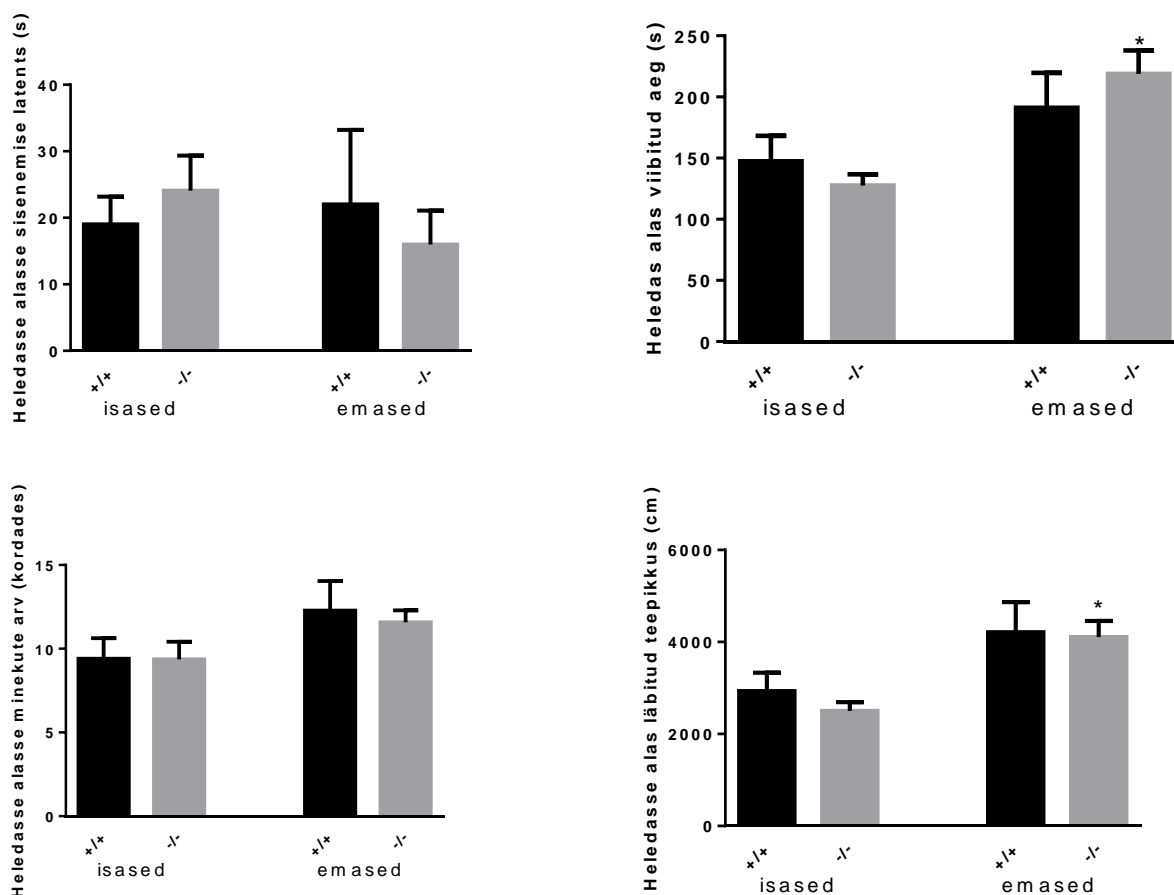
Tagakäppadele tõusude puhul esines aja efekt ( $F(2,68)=17.21$ ;  $p<0.01$ ) ning aja ja soo interaktsiooni efekt ( $F(2,68)=7.66$ ;  $p<0.01$ ). *Post-hoc* analüüs ei näidanud genotüübi- ega sugudevahelisi statistiliselt olulisi erinevusi esimese päeva tagakäppadele tõusude arvus. Emaste metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulike rottide puhul ilmnas, et võrreldes esimese



katsepäevaga tegid mõlemad statistiliselt vähem tagakäppadele tõuse teisel ja kolmandal päeval (joonis 6). Isaste rottide puhul oli antud parameetri vähenemist näha kolmandaks päevaks, kuid vaid metsik-tüüpi loomadel. Isastel Wfs1-puudulikel rottidel jäi kolmanda katsepäeva tagakäppadele tõusude arv samale tasemele kui esimesel päeval.

### 2.3.3 Hele-tume puuri katse

Heledas alas viibitud aja puhul oli statistiliselt oluline soo efekt ( $F(1,36)=11.98$ ;  $p<0.01$ ). Järgnevast *post-hoc* analüüsist selgus, et isased Wfs1-puudulikud rotid viibisid heledas alas statistiliselt vähem aega kui emased Wfs1-puudulikud rotid (joonis 7). Tendents väiksemale heledas alas viibimisele esines isastel Wfs1-puudulikel rottidel võrreldes ka isaste metsik-tüüpi rottidega.



Joonis 7. Hele-tume puuri katse tulemused metsik-tüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikel (-/-) rottidel. \* $p<0.05$

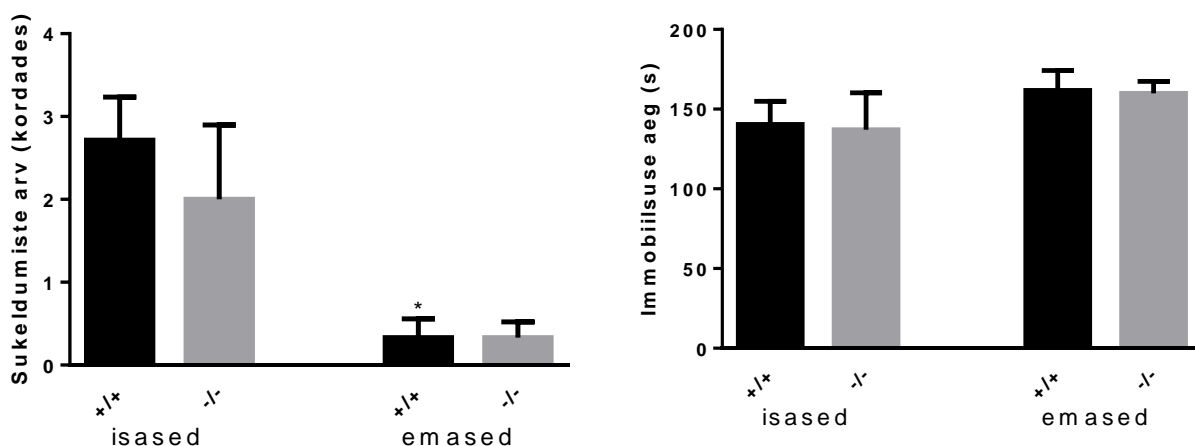
Heledasse alasse minekute puhul leiti statistiliselt oluline soo efekt ( $F(1,36)=4.01$ ). Tulemuste edasisel analüüsil ei ilmnenud statistiliselt olulisi erinevusi gruppide vahel, kuid oli tendents,

et isased Wfs1-puudulikud rotid sooritasid vähem heledasse alasse üleminekuid võrreldes isaste metsik-tüüpi rottidega (joonis 7).

Heledas alas läbitud teepikkuse puhul oli statistiliselt oluline soo efekt ( $F(1,36)=14.01$ ;  $p<0.01$ ). Järgnevast *post-hoc* analüüsist selgus, et isaste Wfs1-puudulike rottide läbitud teepikkus heledas alas oli statistiliselt oluliselt väiksem kui sama genotüübi emastel rottidel (joonis 7). Tendents väiksemale läbitud teepikkusele heledas alas esines isastel Wfs1-puudulikel rottidel ka võrreldes isaste metsik-tüüpi rottidega.

### 2.3.4 Sundujumise katse

Sukeldumiste puhul leiti statistiliselt oluline soo efekt ( $F(1,36)=21.69$ ). *Post-hoc* analüüs näitas, et isased metsik-tüüpi rotid sukeldusid statistiliselt sagedamini kui emased metsik-tüüpi rotid. Isaste gruppide võrdlus näitas, et metsik-tüüpi rottidel oli suurem kalduvus sukelduda kui Wfs1-puudulikel loomadel, kuid tegu oli vaid tendentsiga (joonis 8).



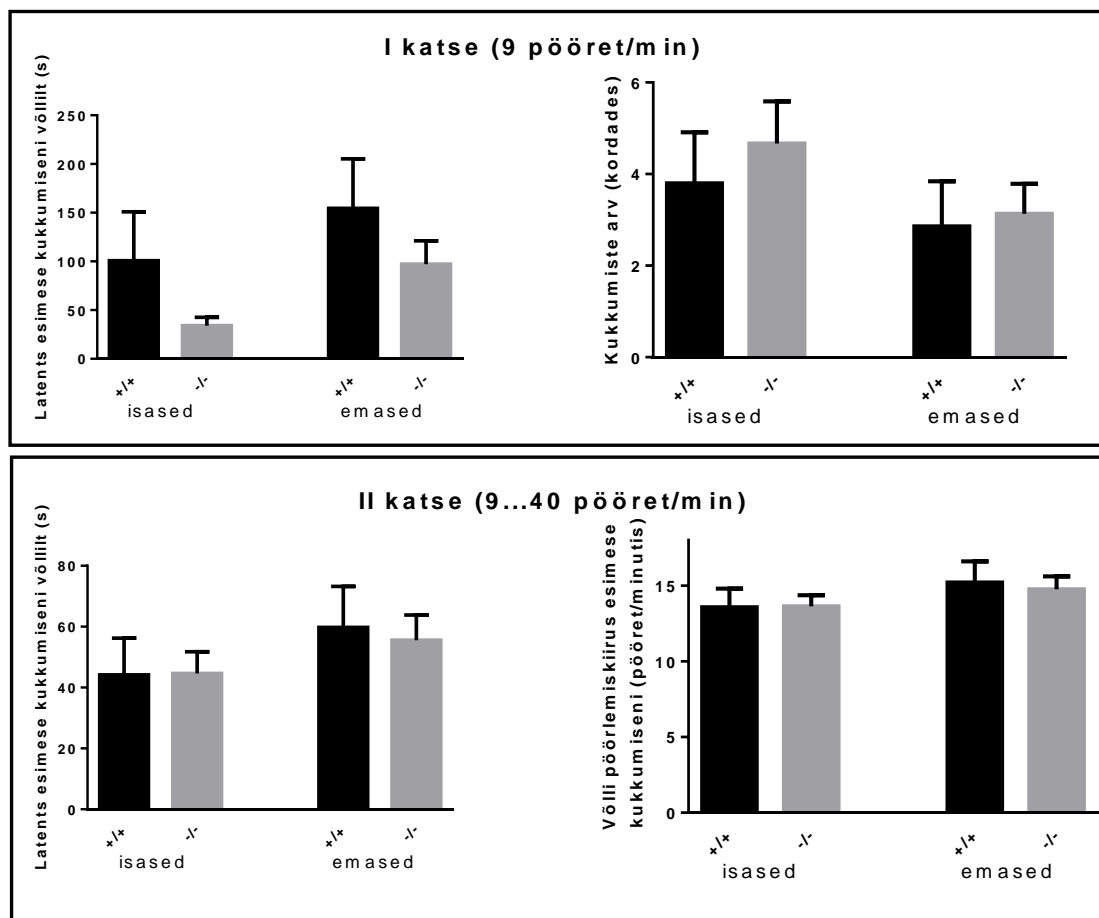
**Joonis 8.** Sundujumise katse tulemused metsik-tüüpi (+/+) ja Wfs1-puudulikel (-/-) rottidel. \* $p<0.05$

Immobiilsuse aja puhul ei leitud olulisi genotüübi ega soo efekte. Genotüübist sõltumata näitasid emased rotid üles veidi pikemaid immobiilsuse aegu kui isased rotid, kuid ka see erinevus ei ületanud olulisuse nivood.

### 2.3.5 Rotarodi katse

Läbi viidi kaks rotarodi katset. Esimeses katses oli võlli pöörlemiskiirus 9 pööret/min ja teises katses oli võlli pöörlemine kiirenev (9-40 pööret/min). Statistiline analüüs ei tuvastanud

mitte ühegi parameetri (latents esimese kukkumiseni, kukkumiste arv, võlli pöörlemiskiirus esimese kukkumiseni) puhul statistiliselt olulist genotüübi või soo efekti (Joonis 9).



**Joonis 9.** Rotarodi katse tulemused metsik-tüüpi (+/+) ja *Wfs1*-puudulikel (-/-) rottidel. \* $p < 0.05$

## 2.4 Arutelu

Varasemad anatoomilised uuringud on näidanud, et Wfs1 valk lokaliseerub ärevusega seotud ajuosades (Luuk jt., 2008). Hiirtega läbi viidud uuringud on demonstreerinud, et Wfs1-puudulikkus on seotud äreva fenotüübi tekkimisega (Luuk jt., 2009), samuti on nende tundlikkus ärevust vähendava toimega ravimite suhtes suurem kui metsik-tüüpi hiirtel (Luuk jt., 2009; Raud jt., 2015). Wfs1-puudulike hiirte ärevam fenotüüp võib tuleneda negatiivsete emotsioonide regulatsiooniga seostatud neurotransmitter-süsteemide muutunud aktiivsusest (Raud jt., 2015; Reimets jt., 2016). Hiljutises uurimistöös leiti, et erinevalt metsik-tüüpi hiirtest põhjustab psühholoogiline stress Wfs1-puudulikel hiirtel teatud ER stressi markerite olulist tõusu temporaalsagaras: aju osas, mis on seotud ärevuse reguleerimisega (Altpere jt., publitseerimisel). Need hiirtega saadud tulemused lubasid oletada, et ärev fenotüüp võib esineda ka Wfs1-puudulikel rottidel. Käesolev uurimus seda aga ei näidanud. Järgnevalt on analüüsitud igat katset individuaalselt.

### Null-puuri ja hele-tume puuri katsed

On näidatud, et pluss-puuri ja hele-tume puuri katsed peegeldavad loomade emotsionaalse käitumise erinevaid aspekte (Ramos jt., 2008), mistõttu hinnati antud töös ärevusega seotud käitumist kasutades hele-tume puuri katset ja pluss-puuri katse analoogi, null-puuri katset.

Null-puuri katsed ei näidanud genotüüpidevahelisi olulisi erinevusi ärevusega seotud käitumises. See tulemus erineb oluliselt Wfs1-puudulike hiirtega saadud tulemustest, kus analoogsetes katsetes leiti ärevuse oluline suurenemine Wfs1-puudulikel hiirtel (Raud jt., 2009, Sütt jt., 2015). Erinevuse üheks võimalikuks seletuseks on liikidevaheline eripära. Näiteks on Wfs1-puudulike hiirte puhul ärevuskatseid võimalik teha 20 lx juures, mis vastab üsna hämarale valgustatusele. Selline valgustatus on hiirte puhul optimaalne ning võimaldab eristada kartlikumaid ja julgemaid loomi (Sütt jt., 2015). Oluliselt kõrgema valgustatuse korral hiired katseseadme avatud alale tulla ei julgenud. Käesoleva töö pilootkatsetes prooviti ärevuskatseid sooritada samuti 20 lx tingimustes, kuid rottide puhul jaotumist ärevateks ja vähem ärevamateks ei toimunud – kõik rotid, sõltumata genotüübist, viibisid pikalt avatud alal ning ei näidanud ärevusele omaseid tunnusjooni. Seetõttu kasutati

käesolevas töös läbiviidud katsetes oluliselt eredamat valgust, mis mingil määral kergendas ärevate ja vähem ärevate loomade diferentseerimist.

Küll aga näitasid katsed statistiliselt olulisi sugudevahelisi erinevusi ärevusega seotud käitumises Wfs1-puudulikel rottidel: emaste Wfs1-puudulike rottidega võrreldes oli isastel Wfs1-puudulikel rottidel statistiliselt suurenenud ärevusega seotud käitumine, millele viitas vähenenud avatud alale sisenemiste arv ning avatud alal viibitud aeg. Samuti esines tendents vähenenud riskihindamiskäitumisele. Sarnased sugudevahelised erinevused esinesid ka metsik-tüüpi rottide puhul, kuid need polnud statistiliselt olulised. Saadud katsetulemused langevad kokku Ferguson ja Gray (2005) töös leitudga. Ka nemad kasutasid oma eksperimentides SD rotte ja kirjeldasid emaste metsik-tüüpi rottide väiksemale ärevusele viitavat käitumist võrreldes isastega. Samas nähti Braun jt. (2011) töös metsik-tüüpi SD rottidel vastupidiseid sugudevahelisi tendentse – isastel rottidel esines null-puuri ärevusega seotud käitumist vähem kui emastel loomadel. Meie tulemuste erinevust Braun jt. omadest võib taaskord põhjendada erinevustega katsetingimustes. Nimelt viidi Braun jt. uuring läbi tunduvalt madalama valgustatuse juures ehk nõrgemas stressogeenses keskkonnas kui antud uuringus. Samuti ei teostatud Brauni jt. uuringus lühiajalist isolatsiooni puurikaaslastest.

Sarnaselt null-puuri katsele ei tuvastatud ka hele-tume puuri katsetes genotüüpide vahel olulisi erinevusi ärevusega seotud käitumises. See tulemus erineb jällegi hiirte hele-tume puuri katse tulemustest (Luuk jt., 2009), kus Wfs1-puudulikud hiired viibisid oluliselt vähem aega heledas alas ja sisenesid metsik-tüüpi loomadega võrreldes heledasse alasse märkimisväärselt harvem. Luugi jt. töö demonstreeris ka katsele eelneva manipulatsiooni määravust katse tulemustele, kuna erinevus metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte käitumises ilmnis ainult juhul kui loomad olid eelnevalt puurikaaslastest lühiajaliselt isoleeritud. Erinevusi otse kodupuurist võtmise puhul ei esinenud. Isolatsioon mõjus metsik-tüüpi loomadele uudistamisaktiivsust suurendavalt, kuid ärevusele kalduvale loomale vastupidiselt. Ka käesolevas katsetes viibisid rotid enne hele-tume puuri katset isolatsioonis (isolatsiooniaja kestus oli 15 minutit nagu Luuk jt. katsetes), kuid see manipulatsioon ei indutseerinud statistiliselt olulisi genotüüбивahelisi erinevusi. On võimalik, et katsele eelnev isolatsiooniaeg oleks pidanud olema pikem või oleks tulnud isolatsiooni asemel kasutada mõnda tugevamat stressorit. Genotüübisisesel võrdlusel leiti, et isastel Wfs1-puudulikel rottidel on statistiliselt suurem ärevusega seotud käitumine võrreldes Wfs1-puudulike

emaste rottidega. Sellele viitas oluliselt lühem heledas alas viibimise aeg ja heledas alas läbitud teepikkus. Samad trendid esinesid metsik-tüüpi rottide puhul: isaste uudistamisaktiivsus aversiivses heledas alas oli madalam kui emaste rottide oma. Seega olid genotüübisisesed trendid samasugused kui null-puuri katses.

### Lokomotoorse aktiivsuse katse

Lokomotoorse aktiivsuse katse esimese päeva tulemustest ei ilmnunud motoorses aktiivsuses genotüüpide ja sugude vahel olulisi erinevusi. Kolmanda katsepäeva tulemuste põhjal võis arvata, et metsik-tüüpi rotid ja emased Wfs1 rotid olid stressogeense keskkonnaga adapteerunud, kuna võrreldes esimese päevaga oli neil vähenenud liikumis- ja uudistamisaktiivsus (läbitud teepikkus ja tagakäppadele tõusude arv olid vähenenud). Isastel Wfs1-puudulikel rottidel kohanemist stressiga aga kolmandaks päevaks toimunud ei olnud. Varasemad uuringud on näidanud, et Wfs1-puudulikud hiired kohanevad stressogeense situatsiooniga halvemini ja see on seotud aju dopamiinergilise ja serotoniinergilise süsteemi (ühed kesksemad neurotransmittersüsteemid negatiivsete emotsioonide regulatsioonis) häirunud talitlusega (Visnapuu jt., 2013). Wfs1-puudulike isaste rottide häirunud adaptatsioon stressiga võib seega tuleneda funktsioonihäiretest nimetatud süsteemides.

### Sundujumise katse

Sundujumise katses ei tuvastatud genotüüpide vahel olulisi erinevusi depressiooniga seotud käitumises. Sellele viitas sarnane immobiilsuse aeg, mis peegeldab passiivset stressiga toimetulekukäitumist (Porsolt, 1979). Ka see tulemus on vastavuses varasemate tulemustega, kus metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulike hiirte immobiilsuse aeg märkimisväärselt ei erinenud (Luuk jt., 2009). Genotüübisisesel võrdlusel leiti, et isased metsik-tüüpi rotid sukeldusid statistiliselt oluliselt sagedamini kui emased metsik-tüüpi rotid. Samas esines tendents, et isased Wfs1-puudulikud rotid sukeldusid vähem kui isased metsik-tüüpi rotid. Väiksemat sukeldumiste arvu võib tõlgendada vähenenud toimetulekukäitumisena (Craft jt., 2010), mistõttu isaste Wfs1-puudulike rottide väiksem sukeldumiste arv toetab mingil määral liikumisaktiivsuse katse järeldust, et neil loomadel on stressiga toimetulek häirunud.

## Rotarodi katse

Kiirendusega ja kiirenduseta rotarodi katsed näitasid, et Wfs1-puudulikel rottidel pole metsik-tüüpi rottidega võrreldes koordineerimine ega peenmotoorika häirunud. Sellele viitas oluliste erinevuste puudumine kukkumiste arvus, latentsis esimese kukkumiseni ja võlli pöörlemiskiiruses esimese kukkumiseni. Meie tulemus langeb kokku varem avaldatud Wfs1-puudulike hiirte tulemusega, mis näitas Wfs1-puudulike ja metsik-tüüpi hiirte sarnast sooritust kiirenduseta rotarodi katses (Luuk jt., 2009).

Liikumisaktiivsuse ja rotarodi katsest võib järeldada, et Wfs1-puudulikkus ei häiri motoorikat ega koordineerimist ja sellega saab välistada, et ärevuskatsete tulemused on tingitud häirunud motoorikast.

## Kokkuvõte

Töös uuriti Wfs1-puudulike rottide käitumist võrreldes normaalse, metsik-tüüpi rottidega kasutades järgmisi katseid:

- Null-puuri katse
- Hele-tume puuri katse
- Liikumisaktiivsuse katse
- Rotarodi katse
- Sundujumise katse

Ühegi katse puhul ei leitud statistiliselt olulisi erinevusi metsik-tüüpi ja Wfs1-puudulike rottide käitumise vahel.

Liikumisaktiivsuse, rotarodi ja sundujumise katses oli see tulemus oodatav, sest ka eelnevates uurimustes, milles kasutati Wfs1-puudulikke hiiri, ei leitud nimetatud katsetes käitumuslike erinevusi võrreldes metsik-tüüpi hiirtega.

Mõnevõrra ootamatud olid tulemused ärevuskatsete (null-puuri ja hele-tume puuri katsete) osas. Seal oli eelnevatest uurimustest hiirtega teada Wfs1-puudulike hiirte oluliselt suurem ärevusega seotud käitumine. Roti genotüüpidevaheliste erinevuste puudumist ärevuskatsetes põhjendati liiga nõrga stressori kasutamisega antud katsetes.

Käitumiskatsetes esines statistiliselt olulisi erinevusi Wfs1-puudulike rottide emas- ja isasloomade vahel, seejuures isasloomad ilmutasid suuremat ärevuskäitumist. See tulemus on kooskõlas varasemate hiirkatsete tulemustega.



# Characterization of Emotional Behavior in Wfs1-Deficient Rats

Laura-Liisa Rohtla

## RESUME

Wolfram syndrome (also known as DIDMOAD) is a recessive neurodegenerative disease caused by a mutation in the Wfs1 gene (Strom et al., 1998). It is characterised by an impaired production of wolframine, a protein responsible for ER stress regulation. The concurrent disturbances in Ca<sup>2+</sup> homeostasis and folding of proteins cause apoptosis, which can lead to complications such as diabetes mellitus, diabetes insipidus, optic atrophy, deafness and various psychiatric disorders (Osman et al., 2003). In order to better understand the disorder and to potentially develop a new model organism for mental illness research, Wfs1-deficient mice have been developed. The anxious phenotype of the Wfs1-deficient mouse may be due to the altered activity of neurotransmitter systems associated with the regulation of negative emotions (Raud et al., 2015; Reimets et al., 2016). The fact that humans have a higher evolutionary proximity to rats than to mice leads us to consider that rats might be preferable test subjects in medical research (Gibbs et al., 2004).

The goal of this paper was to evaluate the impact of Wfs1 deficiency on anxiety-related behaviour, motor activity and behavioural despair in rats. For this purpose, both knock out and wild-type rats were studied during the Rotarod, Locomotor activity, Light-dark box exploration, Forced swimming and elevated Zero maze tests.

The results for the Rotarod, Locomotor activity and Forced swimming tests showed no statistical differences between the behaviour of wild type and Wfs1-deficient rats, which was to be expected, based on past research on Wfs1-deficient mice (Luuk et al., 2009). Somewhat surprisingly, there were no statistically significant differences between the two rat genotypes in the Light-dark box and Zero maze tests. This may have been because of the lack of a potent irritant, such as bright light or prolonged isolation. However, remarkable differences were observed between male and female Wfs1-deficient rats with males displaying higher levels of anxiety than females.

This work characterized the phenotype of Wfs1-deficient rats with a handful of anxiety, depression and locomotor activity tests. Further studies are now required to test the effects of other stressors.

## Tänu sõnad

Soovin siiralt tänada oma juhendajat, Sirli Rauda, kes oli mulle alati toeks ning abiks. Tema mõistev suhtumine, laboris veedetud aeg ja maitsvad suupisted ei lähe mul kunagi meelest.

Samuti soovin tänada Lilian Kadaja-Saarepuud, kes oli nõus mulle kaasihendajaks olema.

Kõige enam soovin avaldada tänulikkust oma perele ja sõpradele, kes mu peale pidevalt mõtlesid ja vajadusel ka abikäe ulatasid.

## Kasutatud kirjandus

Awata, T., Inoue, K., Kurihara, S., Ohkubo, T., Inoue, I., Abe, T., Takino, H., Kanazawa, Y., Katayama, S. (2000). Missense variations of the gene responsible for Wolfram syndrome (WFS1/wolframin) in Japanese: possible contribution of the Arg456His mutation to type 1 diabetes as a nonautoimmune genetic basis. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;268(2):612-6.

Barrett, T. G., Bunday, S. E., Macleod, A. F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet.* 346(8988):1458-63.

Billings, A. G., Moos, R. H. (1984). Coping, stress, and social resources among adults with unipolar depression. *J Pers Soc Psychol.* 46(4):877-91.

Bourin, M., Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 28;463(1-3):55-65.

Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav.* 97(3):406-15.

Caston, F., Vasseur, F., Stelzm, T., Chianale, C., Delhay-Bouchaud, N., Mariani, J. (1995).

Cheng, R., Juo, S. H., Loth, J. E., ... Baron, M. (2006). Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. *Mol Psychiatry.* 11(3):252-60.

Collier, D. A., Barrett, T. G., Curtis, D., Macleod, A., Arranz, M. J., Maassen, J. A., Bunday, S. (1996). Linkage of Wolfram syndrome to chromosome 4p16.1 and evidence for heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 59(4): 855–863.

Craft, R. M., Kostick, M. L., Rogers, J. A., White, C. L., Tsutsui, K. T. (2010). Forced swim test behavior in postpartum rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 96(4): 402–412.

Crawford, J., Zielinski, M. A., Fisher, L. J., Sutherland, G. R., Goldney, R. D. (2002). Is there a relationship between Wolfram syndrome carrier status and suicide? *Am J Med Genet.* 114(3):343-6.

Cryan, R. J. F., Markou, A., Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 23: 238–245.

Cryns, K., Sivakumaran, T. A., Van den Ouweland, J. M., Pennings, R. J., Cremers, C. W., Flothmann, K., Young, T. L., Smith, R. J., Lesperance, M. M., Van Camp, G. (2003). Mutational spectrum of the WFS1 gene in Wolfram syndrome, nonsyndromic hearing impairment, diabetes mellitus, and psychiatric disease. *Hum Mutat.* 22(4):275-87.

Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: Studies in intact and cerebellectomized lurcher mutant mice. *Brain Research. Developmental Brain Research.* 86:311–316.

Domenech, E., Gomez-Zaera, M., Nunes, V. (2006). Wolfram/Didmoad Syndrome, a Heterogenic and Molecularly Complex Neurodegenerative Disease. *Pediatr Endocrinol Rev.* 3(3): 249-257.

- Ferguson, S. A., Gray, E. P. (2005). Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats. *Physiol. Behav.* 85, 621–628.
- Fonseca, S. G., Ishigaki, S., Osowski, C. M., Lu, S., Lipson, K. L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M. A., Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest.* 120(3):744-55.
- Fonseca, S. G., Urano, F., Weir, G. C., Gromada, J., Burcin, M. (2012). Wolfram syndrome 1 and adenylyl cyclase 8 interact at the plasma membrane to regulate insulin production and secretion. *Nat Cell Biol.* 14(10): 1105–1112.
- Gibbs, R.A. jt. (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521.
- Hardy, C., Khanim, F., Torres, R., Scott-Brown, M., Seller, A., Poulton, J., Collier, D., Kirk, J., Polymeropoulos, M., Latif, F., Barrett, T. (1999). Clinical and Molecular Genetic Analysis of 19 Wolfram Syndrome Kindreds Demonstrating a Wide Spectrum of Mutations in WFS1. *Am. J. Hum. Genet.* 65:1279–1290.
- Hatanaka, M., Tanabe, K., Yanai, A., Ohta, Y., Kondo, M., Akiyama, M., Shinoda, K., Oka, Y., Tanizawa, Y. (2011). Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet.* 20(7):1274-84.
- Hofmann, S., Philbrook, C., Gerbitz, K. D., Bauer, M. F. (2003). Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Human Molecular Genet.* 12(16): 2003-2012.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., ... Permutt, M. A. (1998). A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet.* 20(2): 143-148.
- Inoue, H., Tanizawa, Y., Wasson, J., Behn, P., Kalidas, K., Bernal-Mizrachi, E., Mueckler, M., Marshall, H., Donis-Keller, H., Crock, P. et al. (1998) A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nature Genet.* , 20, 143–148.
- Ishihara, H., Takeda, S., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Yamada, T., Inoue, H., Soga, H., Katagiri, H., Tanizawa, Y., Oka, Y. (2004). Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet.* 13(11): 1159-1170.
- Kato, T., Ishiwata, M., Yamada, K., Kasahara, T., Kakiuchi, C., Iwamoto, K., Kawamura, K., Ishihara, H., Oka, Y. (2008). Behavioral and gene expression analyses of Wfs1 knockout mice as a possible animal model of mood disorder. *Neurosci Res.* 61(2):143-58.
- Köks, S., Planken, A., Luuk, H., Vasar, E. (2002). Cat odour exposure increases the expression of wolframin gene in the amygdaloid area of rat. *Neuroscience Letters* 322: 116–120.
- Luuk, H., Koks, S., Plaas, M., Hannibal, J., Rehfeld, J. F., Vasar, E. (2008). Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol.* 20;509(6):642-60.

- Luuk, H., Plaas, M., Raud, S., Innos, J., Sutt, S., Lasner, H., Abramov, U., Kurrikoff, K., Koks, S., Vasar, E. (2009). Wfs1-deficient mice display impaired behavioural adaptation in stressful environment. *Behav Brain Res.* 198(2): 334-345.
- Matsunga, K., Tanabe, K., Inoue, H. (2014). Wolfram Syndrome in the Japanese Population; Molecular Analysis of WFS1 Gene and Characterization of Clinical Features. *PLoS One.* 11;9(9):e106906.
- Matto, V., Terasmaa, A., Vasar, E., Kõks, S. (2011). Impaired striatal dopamine output of homozygous Wfs1 mutant mice in response to [K<sup>+</sup>] challenge. *J Physiol Biochem.* 67(1):53-60.
- Osman, A. A., Saito, M., Makepeace, C., Permutt, M. A., Schlesinger, P. H., Mueckler, M. (2003). Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52755–52762.
- Porsolt, R. D. (1979). Animal model of depression. *Biomedicine.* 30: 139–140.
- Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in pharmacological sciences.* 29 (10): 493–498.
- Raud, S., Reimets, R., Loomets, M., Sütt, S., Altpere, A., Visnapuu, T., Innos, J., Luuk, H., Plaas, M., Volke, V., Vasar, E. (2015). Deletion of the Wolfram syndrome-related gene Wfs1 results in increased sensitivity to ethanol in female mice. *Neuropharmacology.* 95:59-67.
- Raud, S., Sütt S, Luuk, H., Plaas, M., Innos, J., Kõks, S., Vasar, E. (2009). Relation between increased anxiety and reduced expression of alpha1 and alpha2 subunits of GABA(A) receptors in Wfs1-deficient mice. *Neurosci Lett.* 460(2):138-42.
- Reimets, R., Raud, S., Loomets, M., Visnapuu, T., Volke, V., Reimets, A., Plaas, M., Vasar, E. (2016). Variability in the effect of antidepressants upon Wfs1-deficient mice is dependent on the drugs' mechanism of actions. *Behavioural Brain Research.* 53–63, 10.1016/j.bbr.2016.04.011.
- Rendtorff, N. D., Lodahl, M., Boulahbel, H., ... Tranebjaerg, L. (2011). Identification of p.A684V missense mutation in the WFS1 gene as a frequent cause of autosomal dominant optic atrophy and hearing impairment. *Am J Med Genet A.* 155A(6):1298-313.
- Riggs, A. C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R. E., Herrera, P. L., Permutt, M. A. (2005). Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia.* 48(11):2313-21.
- Salamone, J. D., Correa, M., Nunes, E. J., Randall, P. A., Pardo, M. (2012). The behavioural pharmacology of effort-related choice behaviour: dopamine, adenosine and beyond. *J. Exp. Anal. Behav.* 97, 125–146 10.1901/jeab.2012.97-125.
- Sequeira, A., Kim, C., Seguin, M., ... Turecki, G. (2003). Wolfram Syndrome and Suicide: Evidence for a Role of WFS1 in Suicidal and Impulsive Behavior. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 119B:108–113.
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., David, A. F., Colin, J. B., Dourish, T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology.* 116(1): 56–64.

- Strom, T. M., Hortnagel, K., Hofmann, S., Gekeler, F., Scharfe, C., Rabl, W., Gerbitz, K. D., Meitinger, T. (1998). Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Human Molecular Genet.* 7(13): 2021-2028.
- Swift, R. G., Polymeropoulos, M. H., Torres, R., Swift, M. (1998). Predisposition of Wolfram syndrome heterozygotes to psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 3(1): 86-91.
- Sütt, S., Altpere, A., Reimets, R., Visnapuu, T., Loomets, M., Raud, S., Salum, T., Mahlapuu, R., Kairane, C., Zilmer, M., Vasar, E. (2015). Wfs1-deficient animals have brain-region-specific changes of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and mRNA expression of  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 subunits. *J Neurosci Res.* 93(3):530-7.
- Zatyka, M., Ricketts, C., da Silva Xavier, G., Minton, J., Fenton, S., Hofmann-Thiel, S., Rutter, G. A., Barrett, T. G. (2008). Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet.* 17(2):190-200.
- Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet.* 10(5):477-84.
- Visnapuu, T., Plaas, M., Reimets, R., ... Vasar, E. (2013). Evidence for impaired function of dopaminergic system in Wfs1-deficient mice. *Behavioural Brain Research.* 244: 90-99.
- Wolfram, D. J., Wagener, H. P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc.* 1938;9:715–18.
- Yamada, T., Ishihara, H., Tamura, A., Takahashi, R., Yamaguchi, S., Takei, D., Tokita, A., Satake, C., Tashiro, F., Katagiri, H., Aburatani, H., Miyazaki, J., Oka, Y. (2006). WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet.* 15(10): 1600-1609.

## Kasutatud veebiaadressid

Animalactivity kodulehekülg. Loetud: 14. 05.2017 <http://animalactivity.com/image/0399-OF.jpg>

Phenome kodulehekülg. Loetud: 10. 05.2017

[http://phenome.jax.org/grpdoc/Brown1/Brown1\\_Protocol\\_files/elevatedzeromaze.jpg](http://phenome.jax.org/grpdoc/Brown1/Brown1_Protocol_files/elevatedzeromaze.jpg)

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Laura-Liisa Rohtla (sünnikuupäev: 12.06.1995),

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, „Emotsionaalse käitumise iseloomustamine Wfs1-puudulikel rottidel“, mille juhendajad on Sirli Raud ja Lilian Kadaja-Saarepuu

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.08.2017